

NMDA受容体の調節因子D-セリンとD-アミノ酸酸化酵素の脳内分布は一致するか?

著者	堀池 喜八郎, 石田 哲夫
発行年	1996-03
その他の言語のタイトル	Does the distribution of free D-serine, which is a potent activator of the NMDA receptor complex, coincide with the localization of D-amino acid oxidase in brains?
URL	http://hdl.handle.net/10422/6618

NMDA受容体の調節因子D-セリンと
D-アミノ酸酸化酵素の脳内分布は
一致するか？

(課題番号 06670166)

平成7年度科学研究費補助金
一般研究(C)研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 堀池喜八郎
(滋賀医科大学・医学部・教授)

平成7年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

1. 課題番号 0 6 6 7 0 1 6 6
2. 研究課題 NMDA受容体の調節因子D-セリンとD-アミノ酸酸化
酵素の脳内分布は一致するか？
3. 研究代表者 堀池 喜八郎（滋賀医科大学・医学部・教授）
4. 研究分担者 石田 哲夫（滋賀医科大学・医学部・助手）
5. 研究経費 平成6年度 1, 4 0 0千円
- 平成7年度 7 0 0千円
- 計 2, 1 0 0千円

滋賀医科大学附属図書館



1995017582

6. 研 究 発 表

6. 1. 学 会 誌 等

1. Bhat, M. A., Tsuda, M., Horiike, K., Nozaki, M., Vaidyanathan, C. S. and Nakazawa, T.
Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90.
Appl. Environ. Microbiol. **60**, 307-312 (1994)
2. Nagata, Y., Horiike, K. and Maeda, T.
Distribution of free D-serine in vertebrate brains.
Brain Res. **634**, 291-295 (1994)
3. Horiike, K., Tojo, H., Arai, R., Nozaki, M. and Maeda, T.
D-Amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: Regional differentiation of astrocytes.
Brain Res. **652**, 297-303 (1994)
4. Kobayashi, T., Ishida, T., Horiike, K., Takahara, Y., Numao, N., Nakazawa, A., Nakazawa, T. and Nozaki, M.
Overexpression of *Pseudomonas putida* catechol 2,3-dioxygenase with high specific activity by genetically engineered *Escherichia coli*.
J. Biochem. **117**, 614-622 (1995)
5. Horiike, K., Miura, R., Ishida, T. and Nozaki, M.
Stoichiometry of the water molecules in glucose oxidation

revisited: Inorganic phosphate plays a unique role as water in substrate-level phosphorylation.

Biochem. Educ. (in press)

6. 2. 口 頭 発 表

1. 成田充弘, 友吉唯夫, 石田哲夫, 堀池喜八郎
副腎髄質ドーパミン β -水酸化酵素の多型
第82回日本泌尿器科学会総会 (1994)
2. 石田哲夫, 成田充弘, 堀池喜八郎, 友吉唯夫, 野崎光洋
ドーパミン β -モノオキシゲナーゼの多型性
第41回日本生化学会近畿支部例会 (1994)
3. 堀池喜八郎
フラビンの自己会合-アルブミンとの相互作用
第340回ビタミンB研究委員会 (1994)
4. 石田哲夫, 成田充弘, 堀池喜八郎, 野崎光洋
ウシ副腎髄質ドーパミン β -ヒドロキシラーゼのS-S結合した2量体間の相互作用とADPの影響
第67回日本生化学会大会 (1994)
5. 瀧秀樹, 柏木厚典, 田中逸, 高原典子, 原田夏樹, 前川聡, 堀池喜八郎, 繁田幸男
高グルコース培養条件下, ヒト臍帯静脈内皮細胞の接着因子発現と単球の接着異常

第8回糖尿病性合併症研究会 (1994)

6. 石田哲夫, 堀池喜八郎, 野崎光洋

ドーパミン β -モノオキシゲナーゼの構造と活性におけるジスルフィド結合の役割

第68回日本生化学会大会 (1995)

7. 堀池喜八郎

NMDA受容体の調節因子D-セリンとD-アミノ酸オキシダーゼの脳内分布は一致するか

第5回フラビンカンファレンス (1995)

6.3. 出版物

1. Ishida, T. and Horiike, K.

Self-association of flavin: Interaction of FMN with albumin.

Flavins and Flavoproteins (Yagi, K., ed.), pp. 47-50,

Walter de Gruyter & Co., Berlin • New York (1994)

2. 堀池喜八郎

「現代人の栄養学 第17巻, 生化学 (第2版)」(奥恒行, 藤田美明編) 3章 酵素, 6章 ビタミンの生化学, 朝倉書店 (印刷中, 1996)

7. 研 究 成 果

7.1. 研 究 目 的

我々は長年にわたりフラビン蛋白質，特にペルオキシソームに局在するD-アミノ酸オキシダーゼの物理化学的研究を精力的に行ってきた（「アミノ酸代謝と生体アミン」東京化学同人；「蛋白質の分子集合と機能」学会出版センター；「Flavins and Flavoproteins」Elsevier；*J. Biol. Chem.* **260**, 12607, 1985；*J. Biol. Chem.* **260**, 12615, 1985 など）。基質であるD-アミノ酸は動物では生合成されず，外来性D-アミノ酸も極微量であると考えられるため，本酵素の生理的役割は，Hans A. Krebs による発見以来，多くの人の挑戦にもかかわらず未だ不明である。

我々も生理的な役割の解明をめざし，自殺基質（D-プロパルギルグリシン）を開発した（*J. Biochem.* **78**, 57, 1975）。この基質はラットで痙攣やアミノ酸尿・糖尿（ファンコニ症候群）をひき起こした。Enzyme Immunoassay 法も確立し（*Biomed. Res.* **5**, 125, 1984），動物組織での酵素の含有量や分布を免疫化学的に調べ，また ペルオキシソーム中での反応動力学的性質も検討した（*Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 425, 1985）。さらに，本オキシダーゼの含有細胞を同定するために，ニッケルイオンを用いる高感度共役過酸化法を開発した（*Acta Histochem. Cytochem.* **18**, 539, 1985）。中枢神経系では本酵素は，ベルクマン膠細胞（Bergmann glial cell, Golgi epithelial cell）を含めて星状グリア細胞（astrocyte）のみに存在し，ニューロン・内皮細胞・上皮細胞には存在しないことを確認し，特にシナプスを取り囲むグリア細胞の突起に強い活性のあることを明らかにした（特に小脳，*Brain Res. Bull.* **19**, 587, 1987）。

さて最近，精密なD-アミノ酸の分析方法が開発され，哺乳類の脳・腎臓・血中には遊離型のD-セリン・D-アラニン・D-プロリンなどが見い出され

ている。我々はこのうち神経興奮性アミノ酸受容体の1つである N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の活性化剤であるD-セリンに着目して、脊椎動物（魚類・両生類・鳥類・哺乳類）の脳内における分布を調べ、ヒトを含む哺乳類では、NMDA受容体が多く分布する前脳に、遊離D-セリンが ~ 400 nmol/g wet weight (0.4 mM 以上に相当, D/L 比 = 0.4) も存在することを明らかにした。

このように哺乳類における遊離型D-アミノ酸の存在やその作用は最近わかりかけてきたところであるが、その分解酵素であるD-アミノ酸オキシダーゼの分布との関連は全く不明である。そこで本研究では上述の研究の蓄積を基礎として、さらに発展・展開すべく、まず、① 内在性遊離型D-アミノ酸（特にD-セリン）と ② D-アミノ酸オキシダーゼそれぞれの脳内分布を調べ、中枢神経系でのこれらの分布を比較検討し、さらに ③ 含有細胞の電顕的同定を行う。また ④ D-アミノ酸オキシダーゼの酵素化学的・免疫化学的研究も行い、⑤ D-アミノ酸オキシダーゼの生理的意義の多面的解明をめざす。

7.2. 脊椎動物の中樞神経系における遊離D-セリンの分布（参考資料1）

7.2.1. D-アミノ酸とL-アミノ酸の分別定量

1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (FDAA) と反応させたアミノ酸を、2次元薄層（シリカゲル）クロマトグラフィー（TLC）と逆相高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）の組み合わせによって分別定量した。

本法は 20～50 pmol の微量のD型・L型両アミノ酸を検出かつ定量できる非常に感度のよい方法である。

7.2.2. 脊椎動物の脳内での遊離D-セリン含有量

中樞神経系における遊離L-セリンの含有量（湿重量当たり）は魚類・両生類・鳥類・哺乳類において大差はなく、1～2 $\mu\text{mol/g}$ 湿重量であった。

このように脊椎動物の脳内でのL-セリンの含有量は高いが、D型のセリンは魚類（コイ）では全脳にわたってほとんど検出されず、両生類（カエル）の脳や小脳にもほとんど存在しなかった。しかし、鳥類（ニワトリ）の脳（大脳・中脳・延髄・小脳）では 10～20 nmol/g湿重量 程度の微量のD-セリンが存在し、D/L比は 0.01 前後であった。

ところが哺乳類（マウス・ラット・ウシ）の大脳には 400～500 nmol/g湿重量 もの大量の遊離D-セリンが見い出された。D/L比は 0.4 にもなる。遊離のL-セリンの含有量には脳の部位による差を認めなかったが、D-セリンの含有量には部位差があり、大脳に比べて小脳や脳幹では含有量は少なく、哺乳類の小脳でのD/L比は 0.03 以下であった。

これら哺乳類における結果はヒトの脳でも同様であった。

D-Serine Contents in Mammalian Brains

Species	Brain Region	Free Serine (nmol/g wet weight)		
		L	D	(D/L)
Mouse, 8 w	Cerebrum	1290	520	0.425
	Brain Stem	1110	127	0.115
	Cerebellum	989	28	0.029
Rat, 9 w	Cerebrum	928	395	0.425
Bovine	Cerebrum	917	355	0.405
		1020	430	
	Cerebellum	835	20	0.027
		801	24	

D-Serine Contents in Rat Forebrain

Forebrain Region	Free Serine (nmol/g wet weight)		
	L	D	D/L
Olfactory Bulb	874	108	0.123
Right Frontal Lobe	1030	480	0.465
Left Frontal Lobe	827	377	0.456
Right Occipital Lobe	1000	419	0.419
Left Occipital Lobe	853	305	0.358
Hippocampus	464	208	0.448
Hypothalamus	614	250	0.406

7.2.3. ラット前脳での遊離D－セリンの含有量

L－セリンとD－セリンの含有量およびD/L比について、大脳皮質の種々の部位（左右差を含む）による差はなかった。海馬と視床下部ではL型とD型のセリンの含有量はともに大脳に比べ少なかったが、D/L比は大脳と同じで0.4～0.45であった。嗅球では脳の他の部位に比べD/L比は低値であった。

7.2.4. 灰白質と白質におけるセリンのD/L比

ラット大脳では灰白質でのD/L比は白質での値よりも高かったが、ウシ大脳では逆に白質でのD/L比のほうが大であった。ウシ小脳の灰白質と白質におけるD/L比については差は認められなかった。

D/L Ratios of Free Serine in the Grey and White Matter

	Grey Matter	White Matter
Rat Cerebrum (Right)	0.43	0.29
(Left)	0.42	0.25
Bovine Cerebrum	0.27	0.62
Cerebellum	0.01-0.03	0.01-0.03

7.2.5. マウスの生後発達過程における脳内遊離D－セリン含有量の変化

マウスの大脳・脳幹・小脳において、生後1日から23週にわたって遊離セリンの含有量の変化を調べた。

L型の含有量は加齢とともに増加し、8週で成熟マウスのレベルに達した(1 μ mol/g湿重量). 脳の部位における差異は認められなかった.

D型のセリンの含有量は大脳では加齢とともに増大したが ($D/L \approx 0.4$), 小脳と脳幹では生後2週目で最大となり、以後減少し、成熟マウスではD/L比は脳幹で 0.12, 小脳で 0.03 となった.

D/L Ratios of Free Serine in the Brains of Mice of Different Ages

Age	Cerebrum	Brain Stem	Cerebellum
1 day	0.142	—	0.096
8 day	0.192	0.167	0.084
2 weeks	0.258	0.176	0.078
3 weeks	0.226	0.140	0.021
4 weeks	0.331	0.054	0.016
8 weeks	0.403	0.115	0.029
23 weeks	0.384	0.106	0.021

7.2.6. 無菌マウスの脳内における遊離D-セリン含有量

無菌 (germ-free) マウスとS P F (specific pathogen-free) マウスの大脳・脳幹・小脳において、L-セリンとD-セリンそれぞれの含有量に大きな差は認められず、したがって脳の各部位におけるD/L比も無菌マウスとS P Fマウスで同じであった。この結果より、脳内遊離D-セリンは腸内細菌のような微生物に由来するものではないことが示された.

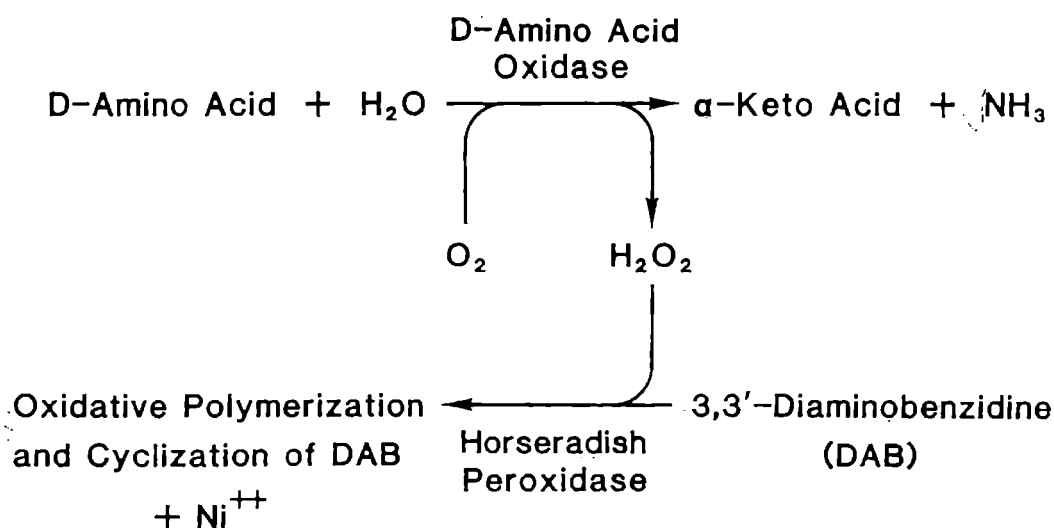
**D-Serine Contents in the Brains of Germ-free and
Specific Pathogen-free Mice (8 weeks old, *n* = 2)**

Brain Region	Free Serine (nmol/g wet weight)					
	Germ-free Mouse			Specific Pathogen-free Mouse		
	L	D	D/L	L	D	D/L
Cerebrum	743	418	0.432	1190	488	0.470
	1070	365		792	443	
Brain Stem	798	86	0.129	1030	185	0.127
	899	133		806	48	
Cerebellum	777	4.4	0.009	940	8.6	0.007
	885	10.6		701	2.9	

7.3. ラット全脳におけるD-アミノ酸オキシダーゼ活性の分布（参考資料2）

7.3.1. D-アミノ酸オキシダーゼ活性の酵素組織化学的検出法

すでにD-アミノ酸オキシダーゼ活性の酵素組織化学的検出法としてニッケルイオンを用いる鋭敏な共役過酸化法を開発している。その方法の原理を下図に示した（*Acta Histochem. Cytochem.* **18**, 539, 1985）。



すなわち、オキシダーゼ反応によって生成した過酸化水素はペルオキシダーゼの基質となり、その酵素反応によって3,3'-ジアミノベンチジンは局所ですみやかに酸化され、不溶性の生成物が形成される（共役過酸化法）。その結果、活性染色される。この反応系に金属イオンを添加すると、金属イオンは3,3'-ジアミノベンチジンの酸化に伴って形成される不溶性の化合物にとりこまれ、染色強度（感度）は増大し、かつ、その色調も変化する。金属イオンとして硫酸ニッケルアンモニウムを用いた場合は、その組織化学的反応生成物は黒くかつ電子密度は大であり、さらに非常に安定である。この方法は操作が簡便であり、経済的で、時間的にも有利である。感度は鋭敏で、組織切片の形態学的保

存もよい。さらに、電子顕微鏡にも適用できるという特色をもっている。

本法によって、D-アミノ酸オキシダーゼの神経解剖学的分布を、ラット全脳の連続固定切片を用いて光学顕微鏡下に組織化学的に調べた。オキシダーゼ活性の超微細構造的局在については電子顕微鏡下に検討した。基質として用いたD-アミノ酸はD-プロリンやD-アラニンであり、このときの反応液の組成は次の通りである。

Incubation Medium

{ 0.1% horseradish peroxidase (Toyobo, Grade III)
0.005% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
0.065% sodium azide
0.6% nickel ammonium sulfate
22 mM D-proline or 28 mM D-alanine
in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6

7.3.2. 全脳での巨視的分布

D-アミノ酸オキシダーゼ活性は終脳では全く検出されず、間脳でもほとんど認められなかった。下垂体や松果体にもオキシダーゼ活性はなかった。オキシダーゼ活性は、下位脳幹（中脳・橋・延髄）、脊髄および小脳のみに限局していた。

脳幹では、オキシダーゼ活性は被蓋に分布し、特に網様体に濃密に分布していた。

活性の組織化学的染色性や分布について、ラットの系統（Sprague-Dawley と Wistar）による差異は認められなかった。また上述の組織化学的分布は生化学的アッセイ（直接的酵素活性の測定）による分布と一致していた。

7.3.3. 含有細胞の同定および電子顕微鏡的局在

光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察から、D-アミノ酸オキシダーゼ活性を示す細胞はすべて、小脳でのベルクマングリア細胞を含めて星状グリア細胞のみであった。他のタイプのグリア細胞（たとえば稀突起グリア細胞）・ニューロン・血管内皮細胞・上皮細胞には全く活性を認めなかった。

上述の結果から、中脳・菱脳・脊髄の星状グリア細胞はD-アミノ酸オキシダーゼを発現しているが、前脳（終脳・間脳）に存在する星状グリア細胞はオキシダーゼを発現していないということ、すなわち星状グリア細胞の all-or-none 型の部位的分化が明らかになった。このようなグリア細胞の分化は世界で初めての報告である。

D-アミノ酸オキシダーゼは細胞内顆粒ペルオキシソームに局在する酵素であるので、グリア細胞が分化しているということは、あるタイプの細胞のペルオキシソームはオキシダーゼを含むが、また別の細胞はこの酵素を含まないということ进行意味する。すなわち、ペルオキシソームに含まれる酵素の分布は不均一であるということが明らかになった。

電子顕微鏡による観察から、特に各種シナプスを取り囲むグリア細胞の突起に強いD-アミノ酸オキシダーゼ活性が存在していた。たとえば中脳の赤核の大細胞部において、神経細胞である赤核大細胞へのシナプスを取り囲む星状グリア細胞の突起が強く活性染色された。また小脳でも、プルキンエ細胞の樹状突起への平行線維の終末や軸索の反回側副枝の終末および籠細胞の軸索やその終末を取り囲むベルクマングリア細胞の突起に強い活性を認めた。ゴルジ細胞の樹状突起への各種ニューロンの終末や小脳糸球を取り囲む星状グリア細胞の突起にもオキシダーゼ活性は分布し、特に小脳糸球中のゴルジ細胞の終末の外側にしばしば強い活性を認めた。

このことから、D-アミノ酸オキシダーゼはこれらシナプスを機能の点において隔離区画化する役割を担っているという可能性が考えられるが、強いオキ

シダーゼ活性に取り囲まれたシナプスのタイプやニューロンの種類、あるいは伝達物質の種類には何の相関も規則性も見いだされなかった。すなわち、強いオキシダーゼ活性は種々のタイプのシナプス周囲のグリア細胞の突起に見出され、オキシダーゼ活性はある一つの特別な種類・タイプのニューロンやシナプスと関係があるわけではない。

7.3.4. 脳の各部位における分布

間脳と中脳の移行部

中脳の網様体の前端は間脳に一部はいり込んでいるが、この網様体が出現しはじめる、正にそのレベル（間脳の最後端あるいは間脳と中脳の移行領域）から下方（尾方）にむけて活性染色された。すなわち、オキシダーゼを発現している星状グリア細胞の出現と網様体の出現とは一致している。

中脳

中脳では、D-アミノ酸オキシダーゼ活性は視蓋（tectum, 旧名は中脳蓋や四丘板）にはほとんど認められず、もっぱら被蓋（tegmentum）のみに限局していた。特に赤核を囲む網様体が濃密に活性染色された。オキシダーゼ活性は網様体全体にわたってみられたが、動眼神経核や滑車神経核中の星状グリア細胞には特に強い活性を認めた。

中脳と橋の移行部（橋の上端）

中脳の最後端・下丘の部位で、橋との移行部（橋の上端）のレベルにおいても網様体に活性を認めた。活性染色には濃淡があった。橋核にも活性を認めたが、オキシダーゼを含有する星状グリア細胞は大脳脚や縫線核中ではまばらであった。

橋

橋の部位でも前述の中脳と同様に活性染色に強弱があり，内側部が強く染まった．特に，橋網様核や外側毛帯腹側核を含む内側被蓋野の星状グリア細胞に強い活性がみられた．しかし，背外側は弱い活性しか示さなかった．中心灰白質，縫線，橋縦束にはオキシダーゼ活性を示す星状グリア細胞はあまりなかった．

橋と延髄の移行部

橋の後端部・延髄の前端部のレベルでも，やはりオキシダーゼ活性の分布には強弱があり，蝸牛神経の腹側核と背側核の星状グリア細胞には特に強い活性があった．しかし，第Ⅶ脳神経である顔面神経核中のグリア細胞での活性は弱く，孤束核には活性は認められなかった．このほか，三叉神経脊髄路核・小細胞網様核・巨大細胞網様核も染色された．

延髄

延髄や頸髄（C₁）のレベルのように脳の下方にくと，全面にわたって強く活性染色された．被蓋において，外側網様体小細胞部と内側網様体大細胞部，すなわち延髄網様体に存在する星状グリア細胞は強いオキシダーゼ活性を示した．延髄では，薄束核や楔状束核という後索核，また三叉神経脊髄路核，内側および外側網様核，下オリーブ核，舌下神経核も強く活性染色された．しかし，最後野や孤束核，また第Ⅹ脳神経である迷走神経背側核に存在する星状グリア細胞はオキシダーゼ活性を示さなかった．

延髄と脊髄の移行部

頸髄でも延髄と同様に全体的に染色されたが，灰白質の方が強く染色された．しかし後角膠様質には活性は認められなかった．延髄と同様に，後索核・三叉神経脊髄路核も強く染色された．

小脳

小脳では全ての層にわたって活性染色されたが、皮質の方が髄質よりも強い活性を示した。分子層では星状グリア細胞の特殊型であるベルクマングリア細胞の突起に強い活性を認めた。プルキンエ細胞は全く活性を示さなかった。顆粒層や白質でも星状グリア細胞のみに活性を認めた。

7. 4. フラビンとタンパク質との相互作用（参考資料3）

今回とりあげたD-セリンなどD-アミノ酸を酸化脱アミノする酵素であるD-アミノ酸オキシダーゼは、FADを補酵素とするフラビン酵素である。FADはビタミンB₂の活性型（補酵素型）であり、オキシダーゼ活性の発現にはビタミンB₂が必須である。

フラビンは水溶液中では単量体のみならず二量体など複数のフラビンが会合したオリゴマーも存在する。すなわちフラビンは自己会合系として存在するリガンドの一つである。このリガンドの会合現象は血管系から脳への輸送過程やアポ酵素への結合過程において重要である。すでに我々はこのようなりガンド自己会合系による見かけの協同性に関する理論を提出しているが（*J. Theor. Biol.* **130**, 49-66, 1988），フラビンの自己会合定数の決定や血清アルブミンとの相互作用に関する実験的研究も行った。

その結果、FMNの自己会合様式として、単量体が単位となってランダムに会合するモデル（isodesmic indefinite self-association of the monomer）が最適であることを明らかにした。その際の自己会合定数は $\sim 200 \text{ M}^{-1}$ と求められた。さらにアルブミン自身のドメイン構造に基づく構造転移（N-B転移）の機構およびその生理的重要性も解明した。

7. 5. 中枢神経系における N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の分布

神経興奮性アミノ酸受容体にグルタミン酸受容体があり、これはイオンチャンネル型(ionotropic) と G タンパク質型(代謝調節型, metabotropic) という 2 種類に大分類される。前者のイオンチャンネル型はさらに三つのサブタイプに細分類され、このうちの一つに N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) がアゴニストになる受容体があり、NMDA (型) 受容体と呼ばれる。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸の受容体とこれによって調節されるイオンチャンネルが受容体-チャンネル複合体として存在している。NMDA 受容体-チャンネル複合体のグリシンが結合する調節部位 (アロステリック部位) に、D-セリンは結合して、この受容体-チャンネル複合体を活性化する。その結果、NMDA 電流は増強する。

ラットの脳内における NMDA 受容体の分布を、D- $[^3\text{H}]$ セリンの結合によるオートラジオグラフィ法で目下検討中である。すなわち γ -aminopropyl-triethoxysilane (APTS) でコートしたスライドガラスに、ラット脳の未固定凍結切片をはりつけ、これを用いて、D- $[^3\text{H}]$ セリンの結合を調べている。予備実験から、D-セリンの結合量は前脳で多い、特に海馬で強かった。これら結合に対する NMDA 受容体の非競合的アンタゴニストの影響等についても検討中である。

予備的な結果ではあるが、哺乳類の中枢神経系では、NMDA 受容体が多く分布する前脳に遊離 D-セリンが大量に存在し、そこではその分解酵素である D-アミノ酸オキシダーゼは発現していないということになる。

7. 6. 脳のエネルギー代謝－基質レベルのリン酸化反応でのリン酸イオンの水としての役割（参考資料4）

脳はエネルギー源として一部ケトン体も利用するが、通常はグルコースのみを利用すると言って過言でない。神経系でグルコースは解糖系・クエン酸回路・呼吸鎖を経て完全酸化分解され、二酸化炭素と水になる。その過程で発生するエネルギーはATPという化学エネルギーとして捕捉され、このエネルギーを消費して神経活動は行われている。このため、脳へは常にグルコースと酸素を送り込み続けなければならない。ここに血糖値維持と循環・呼吸機能の維持というホメオスタシスの意味がある。

さて、生体でのグルコースの完全酸化分解のoverallの反応は、 $\text{glucose} + 38\text{ADP} + 38\text{P}_i + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 38\text{ATP} + 44\text{H}_2\text{O}$ であるので、グルコースの生体内酸化に伴う水分子の生成の stoichiometry について、多くの教科書では、ATPの合成 ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$) に伴って生成する水は $38\text{H}_2\text{O}$ として、これを全数の $44\text{H}_2\text{O}$ から引いて ($44 - 38 = 6$)、1グルコース当たり $6\text{H}_2\text{O}$ が生成すると説明している。しかし基質レベルのリン酸化反応では水の生成はおこらないので、この説明は誤りである。酸化的リン酸化によるATPの合成に伴う水の生成は $34\text{H}_2\text{O}$ であるので、グルコースの生体酸化では正味 $10\text{H}_2\text{O}$ ($44 - 34 = 10$) であり、グルコースの燃焼反応 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$) の場合の $6\text{H}_2\text{O}$ よりも $4\text{H}_2\text{O}$ 多い。グルコースの燃焼は生体と非生体とではちがうのか、 $6\text{H}_2\text{O}$ か $10\text{H}_2\text{O}$ なのか？

問題の $4\text{H}_2\text{O}$ 分は、基質レベルのリン酸化反応の基質である無機リン酸に由来しているのである。解糖系のホスホグリセリン酸キナーゼとクエン酸回路のスクシニル-CoAシンターゼそれぞれの酵素反応において、無機リン酸イオン (HPO_4^{2-}) は " $\text{HO}^- (\text{H}_2\text{O})$ " と " $^+\text{PO}_3^{2-}$ " の二つの部分に分割され、" $^+\text{PO}_3^{2-}$ " の部分はATPやGTPの合成に用いられ、" HO^- " の部分は3-ホスホグリセリン酸やコハク酸のカルボキシル基を構成するために用いられ

る。上の二つの反応は1グルコース当たりそれぞれ2回おこるので、グルコースの酸化過程の間にリン酸イオンの一部という形で4 H₂O消費しているという勘定になる。この数を実際に生成する正味の10 H₂Oから引き (10 - 4 = 6), グルコースの生体酸化でも6 H₂Oの生成がおこることになる。こうして我々は、グルコースの生体酸化においても、燃焼の反応式 (C₆H₁₂O₆ + 6 O₂ → 6 CO₂ + 6 H₂O + エネルギー) を用いてよいことになる。

グルコースの完全酸化分解過程で、各反応や酸化的リン酸化反応に関与するすべての「水分子」だけを数え上げて、1グルコース当たり10 H₂Oの生成となり、グルコースの燃焼式のように6 H₂Oの発生とはならないことは明白である。この一見矛盾する水の stoichiometry は上述のようにリン酸イオンの水としての役割を考えて解決した。すなわち、基質レベルのリン酸化反応に関与する無機リン酸イオンが“高エネルギー”リン酸化合物の合成のためのリン酸基の供給という役割のみならず、その一部がH₂Oとしての役割も担っていることを考慮して、初めてグルコースの生体内での燃焼においても6 H₂Oが生成するということが論理的に説明される。この立場から解糖系やクエン酸回路を経由するグルコースの生体酸化過程について考察した。

現代の生化学はグルコース代謝の研究からスタートしたと言って過言でない。グルコースの生体完全酸化過程（解糖系・クエン酸回路・呼吸鎖）は最も重要な代謝過程であるにもかかわらず、その overall 反応における O₂・CO₂・ATP については、消費・生成する反応やモル数について正しく理解されているが、「6 H₂O」という水の化学量論については今まで無視されているか、あるいは誤った解釈が信じられている。これはグルコースの燃焼式があまりにも当然であるので、「6 H₂O」は先験的に受け入れられているように思われる。グルコース代謝における「水分子」の化学量論という重要なことが未だ論理的に正しく理解されていないことは驚きであった。このことは、現代の生化学・生物学において水は表に現れがたく、筆者らも含め我々はとかく水や体液の存在を忘れがちであるということが原因の一つであると思う。リン酸のこのような役割に注目することは、リン酸イオンそれ自身の代謝における重要性だ

けでなく、水そのものの生命現象への関わりを明確に意識・認識するうえで意義のあることである。

7. 7. 哺乳類の中樞神経系におけるD-アミノ酸オキシダーゼの生理的意義 に関する考察

①星状グリア細胞の部位的分化

星状グリア細胞は全脳内の到るところに存在する。もちろん前脳（終脳・間脳）にも存在し、形態学的には同じ特徴を示すが、下位脳幹（中脳・橋・延髄）・小脳・脊髄に局在している星状グリア細胞（小脳でのベルクマングリア細胞を含む）のみがD-アミノ酸オキシダーゼ活性を示す。すなわち、この酵素を発現している。しかし、終脳や間脳に存在する星状グリア細胞はD-アミノ酸オキシダーゼを全く発現していない。換言すれば、星状グリア細胞は脳内で部位的に分化している。

ニューロンとは対照的に、従来、星状グリア細胞の分化はあまり考えられていず、我々の知る限り、このように部位的に全か無かという例は報告されていない。この例が世界で初めての報告である。

②ペルオキシソーム内の酵素分布の不均一性

D-アミノ酸オキシダーゼはペルオキシソーム酵素のうちのひとつであるが、上の①に述べたように、脳にはこの酵素を発現しているグリア細胞とそうでないグリア細胞がある。このことは肝臓や腎臓でも同じ状況である（D-アミノ酸オキシダーゼは腎臓では近位尿細管細胞に分布し、肝臓では中心静脈周辺部よりも肝小葉周辺部の肝細胞の方が強い活性を示す）。したがって、ペルオキシソーム内の酵素分布は脳の部位（臓器の部位）によって不均一であることを示している。

ある臓器を均一化（ホモゲナイズ）して、超遠心法などによってこの細胞内顆粒を顆粒そのものとしては均一に分離調製しても、その顆粒内の酵素分布は均一でなく、本オキシダーゼからみれば2種類の顆粒が存在することになる。このように細胞内顆粒の酵素（タンパク質）分布の不均一性が明らかになった。

③脳幹でのD-アミノ酸オキシダーゼの分布の特徴

下位脳幹においてD-アミノ酸オキシダーゼの発現の程度（活性染色の強度）は一様でなく強弱があるが、特に被蓋（tegmentum）を主体とする脳幹網様体（reticular formation）に多く発現していた。網様体は末梢からの入力を受けて、それを中継・統合し、上位の中枢に伝達する機能を担いながら、自律機能・運動機能・意識のレベルを統合している。呼吸中枢・心臓抑制中枢・血管運動中枢など生命を支える重要な中枢の存在する場所でもある。この網様体を支えている星状グリア細胞にD-アミノ酸オキシダーゼが特に強く発現しているという事実は、上述の網様体の機能と関係しているのかもしれない。ここでの星状グリア細胞の機能は他の部位に存在するグリア細胞のものとは異なっているのかもしれない。

④D-アミノ酸オキシダーゼの分布の個体発生的・系統発生的特徴

D-アミノ酸オキシダーゼ活性の全くない終脳や間脳は神経管の翼板（alar plate）から発生し、基板（basal plate）を欠くものである。したがって、中脳より上位にいたる本オキシダーゼの分布は、個体発生的に神経管の基板から発生する部位に限られている。

一方、D-アミノ酸オキシダーゼの活性は下等脊椎動物では全脳に一様に分布していることが生化学的に示されている。鳥類の前脳でのオキシダーゼ活性は魚類や両生類の前脳での活性に比べ低い。哺乳類の脳ではオキシダーゼ活性は後脳、特に小脳で非常に高く、前脳ではほとんどなく、中脳での活性は低いことが生化学的に明らかにされている。換言すれば、オキシダーゼは系統発生的に高等になるにつれて、前脳（終脳・間脳）では発現しなくなってくる。このことより、オキシダーゼは高等脊椎動物の脳幹と小脳の星状グリア細胞（ベルクマングリア細胞を含む）の有用なマーカー酵素となる。

このように、D-アミノ酸オキシダーゼの遺伝子の発現は、系統発生的にも個体発生的にも調節されていて、オキシダーゼの分布の意義は発生学的に、グリア細胞の脳内での機能的分化を念頭におきつつ考える必要があろう。

⑤生後発達に伴うD-アミノ酸オキシダーゼの遺伝子発現の変化

ラットの小脳や脳幹でのオキシダーゼ活性は生後2週目から検出されはじめ、その後急速に増大し、4～5週で成熟ラットのレベルに達する。中枢神経系とは対照的に、肝臓や腎臓でのオキシダーゼ活性は出生2日前から認められはじめ、生後2週間以内に成熟レベルに達する。オキシダーゼ遺伝子の発現の調節は組織特異的であることが分子遺伝学的に明らかにされている。ブタの脳での遺伝子発現の調節機構は肝臓や腎臓のものとは異なる。

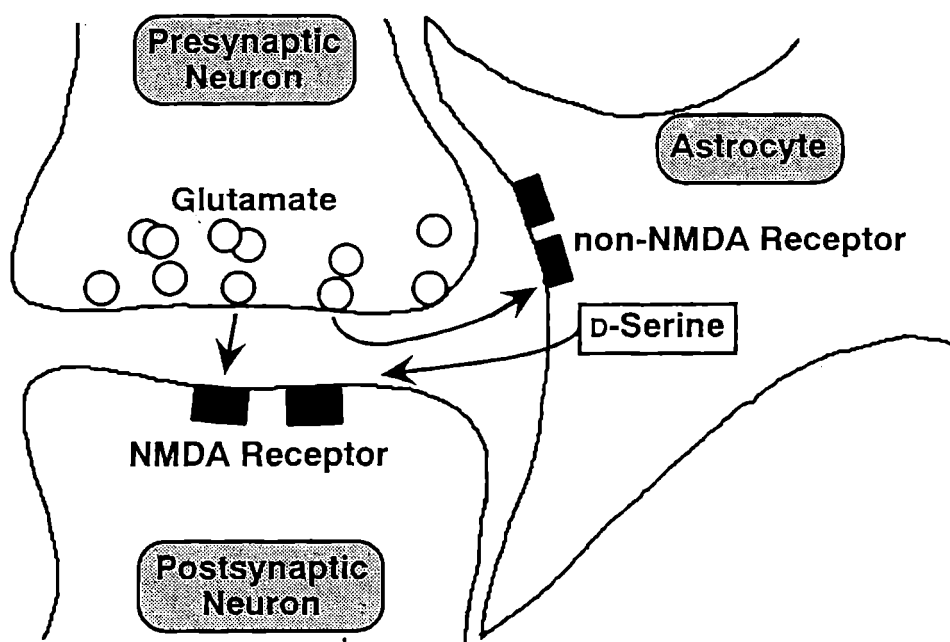
オキシダーゼ活性を通して星状グリア細胞をみれば、上の①で述べたように星状グリア細胞は部位的に分化している。すなわち、オキシダーゼの遺伝子の発現はグリア細胞において部位的に all-or-none 型に調節されている。このような事実とD-アミノ酸オキシダーゼ遺伝子の構造的特徴との関連に興味をもたれる。

⑥D-セリンの脳内分布との関係

神経興奮性アミノ酸受容体であるグルタミン酸受容体のうち、イオンチャンネル型受容体には三つのサブタイプがあり、このうちの一つのN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体は、D-セリンによって活性化される。これは、D-セリンがNMDA受容体-チャンネル複合体のグリシン結合調節部位(アロステリック部位)に結合することによる。上述の7.2.(参考資料1)で述べたように、哺乳類の前脳には遊離D-セリンが ~ 400 nmol/g wet weight (0.4 mM 以上に相当, D/L比 = 0.4)も存在する。昨年(1995), Snyderらは、D-セリンはNMDA受容体の内在性モジュレータである可能性を指摘し、次頁の図のようなモデルを提出した。

このD-セリンの哺乳類の脳での分布(参考資料1)は、その分解酵素であるD-アミノ酸オキシダーゼの分布(参考資料2)と逆相関している。すなわち、脊椎動物での脳内D-セリンの分布や含有量はオキシダーゼ活性に依存していることになる。これらのことを総合的に考察すると次のようになる。D-アミノ酸オキシダーゼは中枢神経系においてD-セリンを含む遊離D-アミノ

Model Depicting the Role of Astrocyte-Derived D-Serine in Neurotransmission at Glutamatergic Synapses



M. J. Schell, M. E. Molliver, and S. H. Snyder (1995)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 3948-3952.

酸を酸化脱アミノし、生理的に分解している。その活性の程度（比活性）はD-アミノ酸の部位的な定常濃度を決定するために重要であると結論される。

Snyderらのモデルが正しいかどうかまだ確定していない。また、D-セリンそのものの起源や供給経路は不明である。今後これらの問題とD-セリンの生理的あるいは病理的な役割を解明するため、さらに研究を展開していかなければならない。

最後に、今回の文部省科学研究費補助金の交付に対し、深く感謝致します。